白背飞虱单克隆抗体的制备及其特性的研究

庞保平[1]*，程家安[1]，陈正贤[2]，李德葆[2]
（1. 浙江大学植物保护系，杭州 310029；2. 浙江大学生物技术研究所，杭州 310029）

摘要： 应用杂交瘤技术，制备出4株高度特异性的白背飞虱单克隆抗体，分别命名为WPH-1H9、WPH-2B6、WPH-2E12和WPH-3F12。这些抗体与其它8种昆虫未发生交叉反应，其中WPH-2B6可与白背飞虱所有虫态发生反应，其余3株只与卵和雌成虫发生反应。应用免疫双扩散法鉴定抗体类型及亚类，结果表明：WPH-2B6为IgG_{2b}亚类，其余均为IgG_1亚类。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western blot印迹分析表明，白背飞虱抗原主要由分子量分别为182、116、66.2及40 kD的4个多肽组成，其中WPH-2B6与182、116 kD的多肽结合，其余3株的单抗只与116 kD的多肽具有亲和性。最后对这些单克隆抗体在捕食作用研究中的应用潜力进行了讨论。

关键词： 白背飞虱；单克隆抗体；杂交瘤技术

中图分类号： Q966　　**文献标识码：** A　　**文章编号：** 0454-6296（2001）01-0021-06

血清学方法是目前研究节肢动物捕食作用的较为理想的方法[1]，特别是酶联免疫吸附试验（ELISA），由于其具有灵敏度高、特异性强、适于大量检测田间样本的特点，已被国内外许多研究者采用[2~7]。然而，所有这一切都必须依赖于高效价和高度特异性的抗血清，而传统的多克隆抗体制备方法常常不能满足这一要求。随着近20年来杂交瘤技术的不断发展，人们已经能够生产高度特异性的单克隆抗体。Lenz和Greenstone[8]最早制备出用于捕食作用研究的单克隆抗体。他们制备的单克隆抗体只与美洲棉铃虫 *Heliothis zea* 5龄幼虫和蛹发生反应，不与其它龄期幼虫和近缘种发生反应，而在此之前幼虫龄期水平上的特异性未曾有过报道。随后Hagler等人相继制备出豆夹盲蝽 *Lygus hesperus*、甘薯粉虱 *Bemisia tabaci* 和棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 的单克隆抗体[9~11]，并对它们在捕食作用研究中应用进行了一系列研究工作[12~14]。这些研究表明，单克隆抗体是研究节肢动物捕食作用的非常有价值的工具，使用单克隆抗体作为分子探针检测捕食者肠道内容物能极大地改进节肢动物捕食作用的研究方法。目前国内还不见这方面研究的正式报道。作者首次成功地制备出白背飞虱 *Sogatella furcifera* 的单克隆抗体，以用于了解稻田捕食性节肢动物对白背飞虱的控制作用。

基金项目：国家自然科学基金重点项目（39630200）的部分内容
* 现工作单位：内蒙古农业大学农学院，呼和浩特，邮编010019
收稿日期：1998-01-09；接受日期：1999-01-09

1 材料与方法

1.1 抗原的准备

将养虫室内饲养的白背飞虱成虫供水饥饿 24 h 后，置于 -20℃ 冰箱中冰冻致死。取出称重后，加入等量的磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH 7.2），研磨后加入适量的磷酸盐缓冲液，在 4℃ 下搅拌 24 h，然后离心（4 000～5 000×g，15 min），分离上清液。沉渣用上述方法重复抽提一次。将两次所得的上清液混合后，低温离心（15 000×g，10 min），去除表层脂肪后，将上清液用冷盐水流动透析 24 h，浓缩后用紫外分光光度仪测定抗原蛋白质含量。

1.2 单克隆抗体的制备

单克隆抗体的制备方法主要参照 Liddell 和 Cryer 的方法[15]。

1.2.1 免疫：选取 10～12 周龄的健康 Balb/c 白鼠 3 只，采用腹腔注射法，每只注射用等量福氏完全佐剂乳化的抗原 200 μL（含抗原蛋白 20 μg）。然后再免疫两次，第一次使用福氏不完全佐剂，最后一次不加佐剂。每次间隔 3 周。最后一次免疫后 3 天，收集抗血清，测定效价。效价最高的用于细胞融合。

1.2.2 细胞融合：采用聚乙二醇（PEG4000）作融合剂，小鼠骨髓瘤细胞系为 SP2/O。将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞混合离心后（400×g，5 min），吸尽上清液，以手指弹匀细胞，缓缓加入细胞融合剂（50% PEG）。静止 90 s 后，逐渐加入 HAT 培养基，分装于事先加有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中，置 5%～10% CO_2 温箱中培养。5 天后换一半 HAT 培养基，再 5 天改用 HT 培养基继续培养，此时亲本均已死去，如有细胞生长即为杂交瘤细胞。

1.2.3 杂交瘤筛选及克隆化：当小孔中细胞生长到一定程度时，即可吸取上清液用间接 ELISA 检测抗体。选出强阳性且不与稻田中其它昆虫发生反应的细胞株，用有限稀释法进行克隆化培养。需经多次克隆化，直至所有孔均为阳性为止。

1.2.4 单克隆抗体的大量制备：将筛选出的杂交瘤细胞株经扩增后，注射入 Balb/c 小鼠腹腔内。7～10 天后腹部肿胀，即可采集腹水。腹水经 50% 硫酸铵提取后，置于 -70℃ 低温冰箱中保存。

1.3 单克隆抗体的特性

1.3.1 抗体类型及亚类：以美国 Sigma 公司的羊抗鼠 IgG_1、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG_3、IgM、IgA、IgE 为标准抗血清，采用免疫双扩散法检测抗体类型。

1.3.2 抗体效价：将抗原稀释至 4 μg/mL（含蛋白）作为抗原包被浓度，以间接 ELISA 测定抗体效价。

1.3.3 特异性：分别以白背飞虱卵、各龄若虫、雌成虫、雄成虫及稻田中其它常见的褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、灰飞虱 *Laodelphax striatella*、黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps*、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*、二化螟 *Chilo suppressalis*、摇纹 *Tendipes* sp.、弹尾虫 *Orchesella*、拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* 等为检测对象，以正常鼠血清为阴性对照，用间接 ELISA 测定抗体的特异性及交叉反应。

1.3.4 抗体所结合的目标蛋白的确定：用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blot 印迹分析技术确定抗体所结合的目标蛋白。具体方法见文献［9］和［16］。

2　结果与分析

2.1　杂交瘤细胞株的建立

经两次融合后，共获得有杂交瘤细胞生长的孔 145 个，经检测阳性孔为 94 个，其中强阳性孔为 11 个，占阳性孔的 11.7%。用有限稀释法对强阳性孔的细胞克隆化，第 1 次克隆后 55%～83.3%的克隆为阳性，第 3 次克隆后 100%为阳性。最后得到 4 个分泌单克隆抗体的细胞株，分别命名为 WPH-1H9、WPH-2B6、WPH-3E12 和 WPH-3F12。经体外长期培养均能稳定地保持分泌单克隆抗体的能力。

2.2　抗体效价

以间接 ELISA 测定抗体效价的结果表明（表 1），4 株经硫酸铵提取的单克隆抗体的效价均达到 5.12×10^5 以上。

表 1　白背飞虱单克隆抗体效价的测定

Table 1　Determination of titers of monoclonal antibodies to *S*. *furcifera* by ELISA

稀释倍数 Dilution（×1 000）	WPH-1H9	WPH-2B6	WPH-3E12	WPH-3F12
16	2.415	2.185	2.118	1.915
32	2.230	1.758	1.511	1.521
64	1.852	1.340	1.295	1.067
128	1.383	0.909	0.888	0.660
256	0.941	0.571	0.493	0.386
512	0.621	0.360	0.285	0.222
1 024	0.344	0.211	0.181	0.129
2 048	0.213	0.134	0.101	0.088
阴性对照 negative control	0.064	0.056	0.054	0.061

样品 OD 值大于阴性对照 OD 值的 2 倍为阳性反应

It is considered positive reaction when OD value of sample doubles above that of negative control

2.3　抗体类型及亚类

经免疫双扩散法测定，结果表明 WPH-2B6 细胞株分泌的单克隆抗体为 IgG_{2b} 亚类，其它 3 株均为 IgG_1 亚类。

2.4　抗体的特异性

4 株单克隆抗体特异性测定结果见图 1。结果表明 4 株单克隆抗体均具有高度的特异性，未与其它 8 种昆虫发生交叉反应。其中 WPH-2B6 与白背飞虱所有虫态发生反应，而其余 3 株只与白背飞虱卵和雌成虫发生反应。

2.5　目标抗原蛋白的确定

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 印迹分析表明（图 2），白背飞虱抗原主要由分

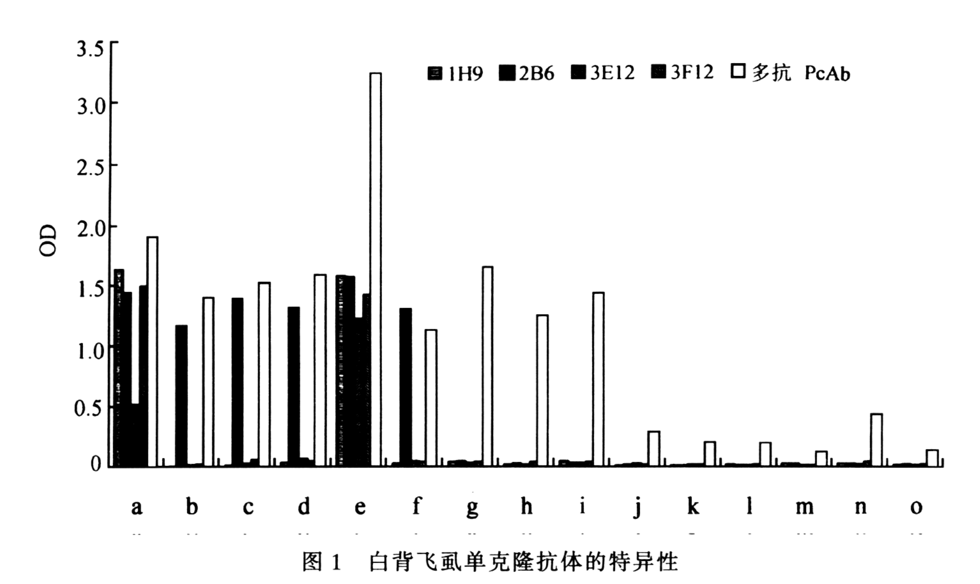


图1 白背飞虱单克隆抗体的特异性

Fig. 1 Reactivity of monoclonal antibodies to *S. furcifera* to 9 species of arthopods

a~f. 白背飞虱 *S. furcifera*: a. 卵 egg; b. 1~2龄 1~2 instar; c. 3~4龄 3~4 instar; d. 5龄 5 instar; e. 雌成虫 female adult; f. 雄成虫 male adult; g. 褐飞虱 *N. lugens*; h. 黑尾叶蝉 *N. cincticeps*; i. 灰飞虱 *L. striatella*; j. 稻纵卷叶螟 *C. medinalis*; k. 二化螟 *C. suppressalis*; l. 摇蚊 *Tendipes* sp.; m. 弹尾虫 *Orchesella*; n. 拟环纹豹蛛 *P. pseudoannulata*; o. 正常鼠血清 normal mouse serum

子量分别为182、116、66.2及40 kD的多肽组成，其中单抗WPH-2B6可与182、116 kD的多肽结合，而其余3株单抗只与116 kD多肽进行特异性结合。

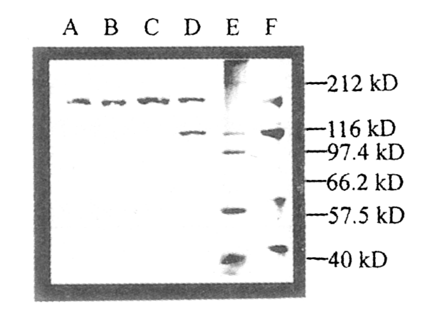


图2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western blot图谱

Fig. 2 Diagrams of SDS-PAGE and Western blot

A、B、C、D分别为单抗WPH-1H9、WPH-3F12、WPH-3E12、WPH-2B6

A, B, C and D are monoclonal antibodies WPH-1H9, WPH-3F12, WPH-3E12 and WPH-2B6, respectively;

E. 标准分子量（Progema公司）molecular weight standards;

F. 抗原 antigen

3 讨论

自从Kohler和Milstein首次成功地建立细胞杂交瘤技术生产单克隆抗体以来[17]，该项技术得到了飞快的发展。目前单克隆抗体几乎被用于生物学、生物化学和医学的各个领域，用于鉴别、定量、分类和纯化各种重要的生物活性物质。单克隆抗体已应用于昆虫发育生物学、生理学和生物化学等领域，应用于捕食者与猎物相互关系的研究，还不到10年的时间[8]，应用单克隆抗体技术的主要问题是，与传统的抗体技术相比，其制备方法复杂、周期长、工作量大、价格昂贵，而且需要专门的仪器设备和熟练的专业技术人员。但是单克隆抗体具有多克隆抗体无法比拟的优点，一是特异性强，人们已经得到发育阶

段特异性的单克隆抗体[8~11]，而多克隆抗体很难达到。二是制备单克隆抗体对免疫原的纯度要求不高，应用粗提的虫体匀浆液作为免疫原，就可筛选出高度特异性的单克隆抗体。而传统的抗体制备技术对免疫原纯度要求高，否则得到的多抗血清将存在严重的交叉反应。如我们得到的同一抗原的鼠抗血清与褐飞虱、灰飞虱和黑尾叶蝉等发生严重的交叉反应（见2.4），同样，用同一抗原制备兔多抗血清也存在严重的交叉反应，无法使用。其他研究者也获得了相同的结果[9]。最后，一旦建立起某种能产生特定抗体的细胞株，就可以连续获得高质量的、均一的单克隆抗体。传统的抗体制备技术，即使使用同一免疫原，不同批次获得的抗体也不同，这给应用带来了一定的限制。

我们当初选择白背飞虱成虫作为免疫原，主要是考虑白背飞虱为渐变态昆虫，其若虫和成虫不仅形态上相似，而且在化学组成上也有许多相同或相似的成分；另外，一些雌成虫很可能怀有卵。因此，从理论上不仅可以筛选出专门针对成虫的单克隆抗体，而且还可获得能与若虫和成虫同时反应的单克隆抗体以及卵特异性的单克隆抗体。从筛选结果看，基本上达到了我们的目标。尽管我们没有获得专门针对成虫的单克隆抗体，但我们制备的抗体，在捕食作用的研究中更有应用价值。因为捕食白背飞虱成虫的捕食性天敌，通常也捕食若虫。稻田中捕食性天敌的种类和数量非常丰富，应用这些抗体可以确定捕食白背飞虱的天敌种类以及捕食状况，从而对捕食性天敌对白背飞虱的控制作用做出正确评价，为充分发挥和利用这些天敌的自然控制作用提供参考。目前将单克隆抗体技术应用于捕食作用的研究还很不够，国内未见正式报道，应加强这方面的研究工作。

参　考　文　献（References）

[1] Sunderland K D. Quantitative methods for detecting invertebrate predation occuring in the field. Ann. Appl. Biol.，1988，112：201～224

[2] 黄　葵，郭予元，谢云陆. 应用酶联免疫吸附试验（ELISA）鉴定粘虫的捕食性天敌. 植物保护学报，1992，19（3）：207～212

[3] 张古忍，张文庆，古德祥. 用ELISA研究稻田节肢类捕食者对稻飞虱的捕食作用. 昆虫学报，1997，40（2）：171～176

[4] Crook N E，Sunderland K D. Detection of aphid remains in predatory insects and spiders by ELISA. Ann. Appl. Biol.，1984，105：413～422

[5] Greenstone M H，Morgan C E. Predation on *Heliothis zea*（Lepidoptera：Noctuidae）：intra-specific ELISA assay for stomach analysis. Ann. Entomol. Soc. Amer.，1989，82：45～49

[6] Miller M C. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay of narrow- and broad-spectrum anti-adult southern pine beetle serum. Ann. Entomol. Soc. Amer.，1981，74：279～282

[7] Sopp P I，Sunderland K D，Fenlar J S *et al*. An improved quantitative method for estimating invertebrate predation in the field using an ELISA. J. Appl. Ecol.，1992，29：295～302

[8] Lenz C J，Greenstone M H. Production of a monoclonal antibody to the arylphorin of *Heliothis zea*. Arch. Insect Biochem. Physiol.，1988，9：167～177

[9] Hagler J R，Cohen A C，Enriquez F J *et al*. An egg-specific monoclonal antibody to *Lygus hesperus*. Biol. Control，1991，1：75～80

[10] Hagler J R，Brower A G，Tu Z *et al*. Development of a monoclonal antibody to detect predation of the sweetpotato whitefly，*Bemisia tabaci*. Entomol. Exp. Appl.，1993，68：231～236

[11] Hagler J R, Naranjo S E, Bradley-Dunlop D *et al*. A monoclonal antibody to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) egg antigen: a tool for predator gut analysis. Ann. Entomol. Soc. Amer., 1994, 87: 85～90

[12] Hagler J R, Cohen A C, Bradley-Dunlop D *et al*. Field evaluation of predation on *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) using a species- and stage-specific monoclonal antibody. Environ. Entomol., 1992, 21: 896～900

[13] Hagler J R, Naranjo S E. Qualitative survey of two coleopteran predators of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) and *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) using a multiple prey gut content ELISA. Environ. Entomol., 1994, 23: 193～197

[14] Hagler J R, Naranjo S E. Determining the frequency of heteropteran predation on sweetpotato whitefly and pink bollworm using multiple ELISA. Entomol. Exp. Appl., 1994, 72: 59～66

[15] Liddell J E, Cryer A. A practical guide to monoclonal antibodies, Chichester: John wiley & Sons Ltd, 1991

[16] 李德葆，周雪平，许建平等. 基因工程操作技术. 上海：上海科学技术出版社，1996. 146～151

[17] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975, 256: 495～497

Development and characterization of monoclonal antibodies to the white-backed planthopper *Sogatella furcifera*

PANG Bao-ping[1]*, CHENG Jia-an[1], CHEN Zheng-xian[2], LI De-bao[2]

(1. Department of Plant Protection, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
2. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Four species- and stage-specific monoclonal antibodies (McAbs) to whole homogenates of adults of the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera*, were developed using hybridoma technology. These McAbs did not cross-react with any other insect species tested with an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Moreover, of the four McAbs, the McAb, namely WPH-2B6, was highly specific to all the stages of white-backed planthopper while the other three reacted only with both the egg and adult female antigens. Immunodiffusion showed that the McAb WPH-2B6 was IgG_{2b} subclass while all the others belonged to IgG_1 subclasses using standard goat anti-mouse antibodies specific to each mouse antibody subclass (Sigma Chemical Co. Ltd., Pode. Dorset). SDS-PAGE and Western blot analyses indicated that the adult antigen was mainly composed of four polypeptides with molecular weights estimated at 182 kD, 116 kD, 66.2 kD and 40 kD, respectively, and McAb WPH-2B6 reacted with two polypeptides with molecular weights of 116 kD and 182 kD respectively while the other three were bound specifically to one with molecular weight of 116 kD. Finally, the potential application of these McAbs to study the predation of natural enemies on the white-backed planthopper is discussed.

Key words: *Sogatella furcifera*; monoclonal antibodies; hybridoma technology

---

* Present address: College of Agriculture, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China